

Purification of nucleic acid by treatment with anion-exchange resin

Publication number: DE19731670
Publication date: 1999-01-28
Inventor: WASCHK DOROTHEA DR RER NAT (DE); ZEUZEM STEFAN (DE); ROTH W KURT (DE)
Applicant: WASCHK DOROTHEA DR RER NAT (DE); ZEUZEM STEFAN PRIV DOZ DR MED (DE); ROTH W KURT PRIV DOZ DR MED (DE)
Classification:
- International: C12N15/10; C12Q1/68; C12N15/10; C12Q1/68; (IPC1-7): C07H21/00; C07H1/08; C12Q1/68
- European: C12N15/10A2B; C12Q1/68A4
Application number: DE19971031670 19970723
Priority number(s): DE19971031670 19970723

Report a data error here

Abstract of DE19731670

Purification and optionally analysis of nucleic acids (I) from biological samples, comprises treating the sample with a synthetic anion-exchange resin having binding affinity for bile acids so that any inhibitors of the subsequent analytical reaction are bound to the resin and removed. Also claimed is the use of colestyramine (II; divinylbenzene-crosslinked polystyrene with quaternary ammonium groups) or colestipol (III; diethylenetriamine-epichlorohydrin copolymer) for purification and/or isolation, and optionally subsequent analysis, of (I) from biological samples.

Data supplied from the esp@ccnet database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 197 31 670 C 2**

⑨ Int. Cl.⁷:
C 07 H 21/00
C 07 H 1/06
C 12 Q 1/68

⑲ Aktenzeichen: 197 31 670.0-44
⑳ Anmeldetag: 23. 7. 1997
㉑ Offenlegungstag: 28. 1. 1999
㉒ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 29. 6. 2000

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑲ Patentinhaber:

Waschk, Dorothea, Dr.rer.nat., 65549 Limburg, DE;
Zeuzem, Stefan, Priv.-Doz. Dr.med., 63303 Dreieich,
DE; Roth, W. Kurt, Priv.-Doz. Dr.med., 65185
Wiesbaden, DE

⑲ Vertreter:

Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner, 80336 München

⑲ Erfinder:

gleich Patentinhaber

⑲ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 1 96 38 362 C1
DE 41 39 664 A1

Pharmazeutische Stoffliste S.242-S.243, Colesty-
ramin;

⑲ Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben

⑲ Verfahren zur Reinigung, gegebenenfalls auch Analyse,
von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, dadurch ge-
kennzeichnet, daß das Verfahren den Schritt umfaßt, daß
die Nukleinsäurehaltige Probe zur Abtrennung von Inhibi-
toren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäu-
re-Analysereaktion mit einer wäßrigen, bis 10 Gew-
%igen Colestyramin-Harz suspension versetzt wird, wobei
als Colestyramin das Colestyramin 20 eingesetzt wird,
das ein Copolymeres von Styrol und etwa 2% Divinylben-
zol mit in die Netzstruktur eingefügten quartären Ammo-
niumgruppen darstellt.

DE 197 31 670 C 2

DE 197 31 670 C 2

DE 197 31 670 C 2

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren (DNA, RNA) aus biologischen Proben, wobei zur Reinigung der Nukleinsäure Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-, insbesondere DNA-Nachweisreaktion abgetrennt werden.

Die Reinigung von Nukleinsäuren spielt eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie. Vor allem die DNA dient als Ausgangsmaterial für genetische Analysen in der labor diagnostischen Forschung und im routinemäßigen Einsatz.

Der Isolierung von Nukleinsäuren wie DNA und RNA aus biologischen Proben, insbesondere aus Proben des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel Blut, Körpersekreten, Gewebeproben, Urin, Stuhl u. dergl., zum nachfolgenden Einsatz in genetische Analysen kommt eine besondere Bedeutung zu, insbesondere im Hinblick auf ein Screening in der Tumordiagnostik sowie zur Diagnose infektiöser Agentien wie Viren oder Bakterien.

So ist zum Beispiel die Analyse der DNA, die aus abgeschilferten Darmepithelzellen von Stuhlproben stammt, von besonderem Interesse zur Diagnostik kolorektaler Tumoren. Von großem Interesse ist auch eine Isolierung der Nukleinsäure aus dem Vollblut, um die isolierte Nukleinsäure einer genetischen Analyse zugänglich zu machen.

Insbesondere soll die dabei anfallende DNA in hoher Reinheit vorliegen und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können.

Eine Nukleinsäure-Diagnostik unter Einsatz von DNA-Amplifikationsansätzen, insbesondere der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, im Folgenden PCR abgekürzt) (s. Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988), Science 239: 487-491), eröffnet vielfältige Ansätze zu einer spezifischen und zugleich sensitiven DNA-Diagnostik, z. B. von Tumoren im Frühstadium, die nicht belastend und für ein Screening gut geeignet sind. Aufgrund der insgesamt geringen DNA-Menge, die aus einer definierten Stuhlmenge isoliert werden kann, scheinen DNA-Amplifikationsansätze wie die PCR-Technik eine geeignete Methode zur Vervielfältigung der interessierenden DNA zu sein.

Hauptschwierigkeiten stellen jedoch Inhibitoren dar, die bei der Anwendung gängiger Extraktionsmethoden gemeinsam mit der DNA der biologischen Probe isoliert werden, und die die in den DNA-Amplifikationsansätzen einzusetzenden Enzyme inhibieren. So hat sich herausgestellt, daß die für die PCR erforderliche DNA-Polymerase inhibiert wird. Insbesondere Stuhlproben und Vollserum sind kritische biologische Ausgangsproben, da sie mit relativ großen Mengen an Inhibitoren behaftet sind.

Die durch die Reinigung und Isolierung anfallende Nukleinsäure (DNA, RNA) soll in hoher Reinheit vorliegen und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können. Die Inhibitoren müssen daher effizient und selektiv abgetrennt werden.

Üblicherweise wird die DNA aus Zellen isoliert. Dabei werden Zellen beispielsweise unter stark denaturierenden und gegebenenfalls reduzierenden Bedingungen aufgeschlossen. Weit verbreitet ist der Aufschluß der Zellen mit denaturierenden Substanzen, z. B. Detergenzien, und die Verwendung von bestimmten Enzymen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren. So wird beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) als denaturierendes Agens verwendet, Proteinase K zum Abbau von Proteinen und RNase A zum Abbau von Ribonukleinsäuren (RNA). Zur vollständigen Denaturierung von Proteinen wird die DNA-haltige Lösung mit dem organischen Lösungsmittel Phenol extrahiert. Durch die anschließende Ethanolpräzipitation erfolgt die Konzentrierung der DNA und gleichzeitig die Entfernung verbleibender Phenolreste aus der deproteinierten, wässrigen Lösung. (Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor).

Die mit einem solchen Verfahren gewonnene DNA, z. B. aus abgeschilferten Darmepithelzellen von Stuhlproben, eignet sich nur begrenzt für den Einsatz in die sich anschließenden Folgereaktionen, insbesondere enzymatische Amplifikationsreaktionen, wie die PCR. So belegen jüngere Daten, daß sich nur in 103 Fällen von insgesamt 230 extrahierten Stuhlproben (Effizienz von 44,7%) die DNA mittels PCR amplifizieren läßt (Villa, F., Dugani, A., Rebecchi, A. M., Vignoli, A., Grolla, A., Bultafoco, P., Losi, L., Perini, M., Trande, P., Merighi, A., Lerosa, R. and Manenti, F. (1996), Gastroenterology, 110: 1346-1353).

Deuter et al. veröffentlichten 1995 eine Methode zur Isolierung von DNA aus Stuhlproben, die das beschriebene Verfahren zeitlich verkürzt und vereinfacht (Deuter, R., Pietzsch, R., Hertel, S. and Müller, O. (1995), Nucl. Acids Res., 23: 3800-3801). Die sich im Stuhl befindlichen abgeschilferten Darmepithelzellen werden lysiert und mit einem Adsorbens (Kartoffelmehl oder Kartoffelstärke oder Rinderserumalbumin) enthaltenden Puffer extrahiert. Zum Abbau von Proteinen und nukleinsäurespaltenden Enzymen wird die DNA-haltige Lösung mit der Proteinase K inkubiert. Die zeitliche Verkürzung dieses Verfahrens beruht darauf, daß die Phenolextraktion und anschließende Ethanolfüllung durch die Verwendung von Zentrifugationssäulen (QIAamp spin columns, QIAGEN GmbH) ersetzt werden. Während die DNA reversibel an eine Silikamembran in der Säule bindet, werden störende Verbindungen durch die Verwendung eines geeigneten Waschpuffers infolge der Wirkung von Zentrifugalkräften durch die Membran gepresst und somit abgereinigt. Durch Zugabe eines geeigneten Puffers wird die gereinigte DNA infolge eines Zentrifugationsschrittes von der Säule eluiert. Da sich jedoch Flüssigkeiten nicht vollständig aus solchen Membranen entfernen lassen, hat man immer mit einem Verlust der DNA-Ausbeute zu rechnen. Die nach diesem Verfahren gewonnene DNA liegt nicht in ausreichend guter Qualität ($A_{260}/A_{280} = 1,5$) und Menge (2 µg DNA/200 mg Stuhlprobe) vor, Folgereaktionen, insbesondere die PCR, erfordern eine hohe und reproduzierbare Ausbeute der DNA-Rohpräparate unter gleichzeitiger intensiver Abreinigung störender Inhibitoren.

Die Amplifikation eines definierten Gens/Genabschnitts der nach der von Deuter et al. beschriebenen Methode präparierten DNA mittels einer einfachen PCR zeigt eine Effizienz von 16%. Auch durch eine nachfolgende Phenolextraktion dieser DNA läßt sich die Amplifikationseffizienz nur von 16 auf 40% erhöhen. Lediglich die Anwendung einer verschachtelten ("nested") PCR, die sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit und Sensitivität, bei gleichzeitiger Ausdünnung potentieller Inhibitoren, auszeichnet (Newton, C. R. and Graham, A. (1994), PCR, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland), erzielt eine erhöhte Amplifikationsausbeute von 66%. Es ist wünschenswert, die DNA in ausreichender Menge und in reproduzierbar guter Qualität zu isolieren, so daß definierte Gene/Genabschnitte

DE 197 31 670 C 2

in einer einfachen, d. h. nicht verschachtelten, PCR vervielfältigt werden können. Die Durchführung einer verschachtelten PCR zeigt sich für bestimmte Anwendungen (z. B. routinemäßige Untersuchungen im diagnostischen Labor) nachteilig, da hier die Rate der falsch Positiven durch Produktkontaminationen erhöht ist.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren (DNA, aber auch RNA) aus ungereinigten biologischen Proben wie Vollblut oder Stuhlproben; dabei soll die Nukleinsäure in ausreichender Menge vorliegen und nicht mit Inhibitoren verunreinigt sein, so daß sie direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, wobei das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäure-haltige Probe zur Abtrennung von Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analysereaktion mit einer wäßrigen, bis 10 Gewichts-%igen Colestyramin-Harz suspension versetzt wird, wobei als Colestyramin das Colestyramin 20 eingesetzt wird, das ein Copolymeres von Styrol mit etwa 2% Divinylbenzol mit in die Netzstruktur eingefügten quartären Ammoniumgruppen darstellt.

Als Nukleinsäurearten kommen sowohl DNA als auch RNA in Frage. Aufgrund der größeren Bedeutung, vor allem aber weil Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen in der Regel auf DNA-Proben aufgebaut sind (vgl. die PCR), wird die Erfindung im Folgenden stellvertretend zur Isolierung von DNA beschrieben.

Wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung des speziellen Colestyramins, das die selektive Abreinigung der Inhibitoren ermöglicht, zur Reinigung und Isolierung der DNA. Das spezielle Copolymer dient dabei als Anionenaustauscher-Harz, welches überraschenderweise die stofflich bisher nicht charakterisierten Inhibitoren stark bindet, während die DNA wesentlich schwächer gebunden wird und somit eine effiziente Trennung von Inhibitoren und DNA erzielt wird.

Die aus dem Copolymeren gebildeten Harze können Additive enthalten.

Zur Ladungsabsättigung enthält das Copolymer zudem geeignete Salzpartner, wie zum Beispiel Chlorid. Colestyramin (hier: Colestyramin 20) ist der internationale Freiname für das Plasma-Cholesterinspiegel senkende Copolymer von Styrol (Vinylbenzol) und etwa 2% Divinylbenzol mit in die Netzstruktur eingefügten quartären Ammoniumgruppen. Das Colestyramin-Granulat ist auch bekannt als ein stark hydrophiles, wasserlösliches, basisches Anionenaustauscherharz zur Bindung von Gallensäuren bei Gallensäurenverlustsyndromen und zur Behandlung von Hypercholesterinämie. Der Lipidsenker Colestyramin wird von der Firma STADAPHARM vertrieben.

Es hat sich gezeigt, daß bereits ein einmaliges Versetzen des erfindungsgemäß eingesetzten Anionenaustauscher-Harzes eine ausreichende selektive Abreinigung der Inhibitoren ermöglicht. Die eingesetzte Menge des speziellen Copolymeren beträgt 10 Gew.-% und weniger, bezogen auf das Gesamtgewicht der behandelten Probe. Oberhalb dieser Menge besteht die Tendenz, daß nicht nur die Inhibitoren, sondern auch die gewünschte DNA in zunehmendem Maße an das Harz gebunden wird.

Ein weiteres, überraschendes Ergebnis ergab sich aus einem Vergleich zu anderen, basischen Anionenaustauscher-Harzen, wie einem IPLC-MonoQTM-System, einem Diethylaminocetyl-Harz (DEAE-SephacelTM; DE-52) oder dem QiagenTM-Silikamembranaustauscher. Obwohl es sich um das gleiche Prinzip eines Anionenaustausches handelt, bindet das anionenaustauschende Copolymer aus Vinyl- und Divinyl-Monomeren die Inhibitoren aus dem biologischen Ausgangsmaterial selektiver und effektiver, so daß die nachfolgenden Nukleinsäure-Analysereaktionen bereits bei Anwendung einer einfachen PCR sehr hohe Amplifikationsraten erbringen. Wesentlich bessere Resultate ergeben sich bereits beim Einsatz einer geringeren Menge an Anionenaustauscher-Harz, und ferner sind eine geringere Anzahl an Extraktionsschritten erforderlich; in der Regel reicht ein Inkubationsschritt aus.

Die mit der Erfindung erzielbare, selektive Abtrennung der Inhibitoren wird auch bei ungereinigten Ausgangsproben erreicht.

So hat sich das erfindungsgemäße Verfahren als besonders wirksam erwiesen bei bisher sehr problematischen Ausgangsproben, z. B. bei Vollblut, das mit Citrat und EDTA oder der PCR inhibierenden Substanz Heparin behandelt wurde, sowie bei Stuhlproben, die aus der Lyse von im Stuhl abgeschilften Darmepithelzellen stammen und einen hohen Anteil an nicht bekannten Inhibitoren aufweisen.

Bei biologischen Ausgangsproben, bei denen die zu isolierende Nukleinsäure intrazellulär vorliegt, wie beispielsweise abgeschilferte Darmepithelzellen enthaltende Stuhlproben, sind die Zellen zunächst zu lysieren, um das intrazelluläre Material aufzuschließen.

Die Lyse bzw. der Aufschluß der Zellen kann durch eine gleichzeitige physikalische und chemische Einwirkung auf die körperzellenhaltige Probe erzielt werden. Das Probenmaterial kann vor der Lyse in tiefgefrorenem Zustand (80°C) vorliegen. Im Lysepuffer ist geeigneterweise ein denaturierendes Agens, z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS) oder andere Detergentien enthalten, welches den chemischen Aufschluß der Zellen bewirkt, während das Verfließen der Suspension, beispielsweise mit einem automatischen, mechanischen Rührsystem, den mechanischen Aufschluß begünstigt. Bei Stuhlproben hat sich gezeigt, daß bei sehr fester Konsistenz ein kräftiges Durchmischen der Probe mit einem Reagenzglaschüttler die Folgeanwendungen erleichtert. Durch einen Zentrifugationsschritt können Zelltrümmer, unverdaute Nahrungsmittelreste oder andere Makroreste entfernt werden.

Anschließend an die Lyse erfolgt die Behandlung des Nukleinsäurehaltigen Zellysats mit dem erfindungsgemäß eingesetzten, speziellen Anionenaustauscher-Harz. Es empfiehlt sich, das Harz in einem geeigneten Puffer, beispielsweise dem Lysepuffer, vorzuquellen, um Verluste des Volumens der wässrigen Nukleinsäure-Lösung zu vermeiden.

Es hat sich gezeigt, daß eine wässrige, bis 10 gewichts-%ige, insbesondere 5 bis 10 gewichts-%ige Harzsuspension des Copolymeren die Inhibitoren in ausreichender Menge bindet und gleichzeitig die Konzentration der in der wässrigen Lösung vorliegenden DNA nicht oder nur unwesentlich herabsetzt.

Geeigneterweise steht dabei die eingesetzte Menge an Copolymer-Harz zu der Häufigkeit der Umsetzung in einem umgekehrten Verhältnis. Das heißt, bei einem relativ hohen Gehalt, insbesondere bei 7,5 bis 10 Gew.-% Harzsuspension in wässrigem Medium, ist eine einmalige Umsetzung vorzuziehen, während im niedrigeren Gehaltsbereich, etwa von 2,5 bis 7,5 Gew.-% und insbesondere um 5 Gew.-% (± 1 Gew.-%), eine zwei- oder mehrmalige Umsetzung bessere Resultate

DE 197 31 670 C 2

liefert. Das vorzugsweise zu wählende Verhältnis von Harzgehalt zu Häufigkeit der Umsetzung hängt aber auch von dem jeweils zu untersuchenden Probenmaterial ab. So ist bei Stuhlproben ein einmaliges Umsetzen mit 10 Gew.-% oder ein zweimaliges Umsetzen mit jeweils 5 Gew.-% Copolymer-Harz gut geeignet. Bei Vollblut sind Gehaltsbereiche unter 5 Gew.-% vorzuziehen, wobei ein zweimaliges Umsetzen mit jeweils 2,5 Gew.-% Copolymer-Harz besonders gut geeignet ist.

Zur Abreinigung wird am einfachsten die Nukleinsäure-haltige (ggf. nicht vorgereinigte) Probe mit der Harz-Suspension versetzt, sehr gut gemischt, und dann wieder vom Copolymeren-Harz abgetrennt. Letzteres kann bequem durch ein Abzentrifugieren des Harzgranulats erfolgen.

Es hat sich herausgestellt, daß eine zu häufige Wiederholung der Extraktion, insbesondere bei hohem Vergleichs-Mengeneinsatz von über 10 Gew.-%, zu einer nachteiligen Reduzierung der Nukleinsäure-Menge führt. Die Ursache hierfür bleibt ungeklärt. Es wird vermutet, daß das spezielle Copolymer zunächst die Inhibitoren bindet und dadurch abgesättigt wird. Fehlen jedoch die Inhibitoren in der wässrigen Lösung, kann das spezielle Copolymer aufgrund seiner Ladungseigenschaften verstärkt die Nukleinsäure binden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine ausreichende Abreinigung von Inhibitoren für gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Nachweisreaktionen unter gleichzeitigem Erhalt einer genügend hohen Nukleinsäure (DNA)-Konzentration sichergestellt.

Anschließend an die Inhibitorabreinigung kann die DNA weiter isoliert werden. Vorteilhaft ist es, hierfür zunächst unspezifisch wirkende Proteinasen wie die Proteinase K einzusetzen, um Proteine und Nukleinsäure-spaltende Enzyme abzubauen. Danach erhält man eine viskose, gallertartige Flüssigkeit. Daraus wird die DNA vorzugsweise mittels Phenol-extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase isoliert. Alternativ läßt sich die DNA durch die Verwendung eines Detergens, beispielsweise eines chaotropen, Guanidin-haltigen Detergens (wie DNAzolTM von Gibco BRL), mit anschließender Ethanol-fällung aus der wässrigen Phase isolieren. Dazu wird die DNA-haltige, mit Proteinase K verdaut Lösung mit dem Detergens und Ethanol versetzt und sofort durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert. Da weder organische Lösungsmittel (Phenol, Chloroform) eingesetzt werden, noch mehrere Zentrifugationsschritte zur Extraktion nötig sind, ist dieses Verfahren sehr anwenderfreundlich und zeitsparend. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Phenol oder chaotropen Detergentien zur Isolierung von DNA kann alternativ durch den Gebrauch von für diesen Zweck bekannten Zentrifugationsröhrchen ersetzt werden, beispielsweise durch QIAamp-spin columnsTM von QiagenTM. Hierbei eignet sich zur Zellyse sowohl ein Proteinase K-Verdau, sowie die Verwendung von kommerziell erhältlichen Lysepuffern (z. B. AVL-Puffer des QIAamp Viral RNA KitsTM von Qiagen, Hepatitis C Virus-Lysereagenz des AmpliCor HC-V KitsTM der Hoffmann-La Roche AG). Bei der Verwendung der käuflichen Lysepuffer erfolgt die Behandlung der Proben analog dem jeweiligen Protokoll der Hersteller.

An die Reinigung bzw. Isolierung der DNA bzw. RNA können sich dann - je nach Wunsch - Folgeaktionen anschließen. Die hierfür erforderliche Qualität der Nukleinsäureprobe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Verfügung gestellt. Die erfindungsgemäße Verfahrensweise gewährleistet eine Präparation der Nukleinsäure mit hoher Ausbeute (beispielsweise 10-15 µg DNA pro 200 mg Stuhlprobe) und Reinheit ($A_{260/280} = 1,7$) unter Abreinigung von Inhibitoren enzymatischer Reaktionen und erlaubt es, eine qualitativ reproduzierbare Analytik durchzuführen, insbesondere in Kombination mit enzymatischen Verfahren zur Amplifikation von DNA.

Es hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren in besonders günstiger Weise mit einer PCR-Amplifikation kombiniert werden kann, wobei bereits eine einfache PCR in 87% aller untersuchten Stuhlproben zum Erfolg führte.

Die gemäß dem erfindungsgemäßen Reinigungsverfahren gereinigte bzw. isolierte DNA wird vorzugsweise einer PCR unterworfen, die in Gegenwart eines Trägerproteins, wie Rinderserumalbumin (BSA), ausgeführt wird. Die Trägerproteinkonzentration wird dabei hoch gewählt, vorzugsweise mehr als 50 µg/ml. Sehr gute Amplifikationsraten haben sich bei Trägerprotein-Konzentrationen im Bereich von 120-200 µg/ml ergeben. Weiterhin wirken sich relativ hohe Konzentrationen an für die PCR erforderlichen Nukleotiden (Desoxyribonukleosid-Triphosphate), Primer und DNA-Polymerasen wie der Taq-DNA-Polymerase vorteilhaft aus. Die Nukleotidkonzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von 150-225 µM. Gleichzeitig liegt die Primerkonzentration im Bereich von 0,75 bis 1,25 pH. Der Gehalt an DNA-Polymerase liegt gegebenenfalls im Bereich von 2,5 bis 3 Units pro 50 µl-Ansatz.

Die Amplifikation erfolgt hinsichtlich der beabsichtigten routinemäßigen Anwendung im diagnostischen Labor vorzugsweise durch eine einfache PCR, in der 30-35 Temperaturzyklen durchlaufen werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Isolierung von DNA aus einer Stuhlprobe

200 mg Stuhlmaterial wird für die Dauer von mindestens einer Stunde bei -80°C tiefgefroren, anschließend mit 600 µl Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS, pH 9.0) versetzt und homogenisiert. Die lysierte Probe wird 10 min. bei 4°C und 6000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, um grobe Stuhlpartikel, Zelltrümmer, Bakterien und Nahrungsmittelreste abzutrennen. Der Überstand wird ein zweites Mal bei 4°C, 20000 x g 10 min. zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird mit dem gleichen Volumen einer Colestyramin-Lösung (5% Colestyramin in Lysepuffer) versetzt, gut durchmischt, 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei 20000 x g zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Extraktionsschrittes wird der klare Überstand mit der Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56°C inkubiert. Die verdaut Probe wird mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25 : 24 : 1) versetzt, gut durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur und 20000 x g abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24 : 1) versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Aus der wässrigen, oberen Phase kann die DNA durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fa-

DE 197 31 670 C 2

chem Volumen 100%igem Ethanol, pelletiert werden. Das in 75%igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 10–15 µg pro 200 mg Stuhlprobe mit einem $A_{260/280}$ -Verhältnis von 1,7. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einem 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch setzt sich wie folgt zusammen:

10 mM Tris-HCl, pH 8,3
50 mM KCl
2,0 mM $MgCl_2$
200 mM jedes dNTP
160 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)
1 µM jeder Primer
2,5 U Taq-DNA-Polymerase pro 50 µl-Ansatz

Beispiel 2

Isolierung von DNA aus Vollblut

500 µl Citrat-, Heparin- oder EDTA-Blut oder tiefgefrorenes und wieder aufgetautes Blut werden mit 500 µl Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS, pH 9,0) versetzt und gut durchgemischt. Die DNA-haltige Lösung wird mit dem gleichen Volumen einer Colestyranin-Lösung (2,5% Colestyranin in Lysepuffer) versetzt, gut durchgemischt, 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Extraktionsschrittes wird der klare Überstand mit der Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56°C inkubiert. Die verdauten Probe wird mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gut durchgemischt und 5 min. bei Raumtemperatur und $20000 \times g$ abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24 : 1) versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach effizienter Lyse aller eukaryontischen und/oder prokaryontischen Zellen und/oder Viren (gleichzeitige Inaktivierung infektiöser Pathogene) und durch Denaturierung und enzymatischen Abbau von Proteinen (gleichzeitige Entfernung der an die Nukleinsäure gebundenen Proteine) kann die DNA aus der wässrigen, oberen Phase durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100%igem Ethanol, pelletiert werden. Das in 75%igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird in 30 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 5–10 µg pro 500 µl Vollblut mit einem $A_{260/280}$ -Verhältnis von 1,7. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einem 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch setzt sich wie folgt zusammen:

10 mM Tris-HCl, pH 8,3
50 mM KCl
2,0 mM $MgCl_2$
200 mM jedes dNTP
160 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)
1 mM jeder Primer
2,5 U Taq-DNA-Polymerase pro 50 µl-Ansatz

Nachfolgend sind die Ergebnisse von Vergleichsversuchen dargestellt, wobei der Einsatz des erfindungsgemäß verwendeten Colestyranins mit herkömmlichen Anionenaustauscherharzen verglichen wird. Die Versuchsdurchführung verlief wie im Beispiel 1 beschrieben.

DE 197 31 670 C 2

Vergleichsversuche		2*				6*				7*			
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/10	1/100	1/1000	1/10000
+DNA in PCR*	Colestyramin 5%	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dowex 50%, RT	-	(+)	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	Colestyramin 2,5%	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	Amberlite gesättigt	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
	Dowex Gel gesättigt	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	Amberlite 50%	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	Amberlite 20%	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	Amberlite 1%	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	Dowex 10%	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	Dowex 1%	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
-DNA in PCR*	Colestyramin 5%	-	(+)	+	+	(+)	+	(+)	(+)	+	(+)	-	-
	Dowex 50%, RT	-	-	+	+	-	(+)	+	+	-	-	-	-
	Colestyramin 2,5%	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	Dowex Gel gesättigt	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Amberlite gesättigt	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amberlite 50%	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amberlite 20%	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amberlite 1%	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dowex 10%	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dowex 1%	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* Stuhlproben von 3 verschiedenen Probanden

* oben: Zugabe (+) von chromosomaler DNA in den PCR-Ansatz, um die Abreinigung des Inhibitors zu überprüfen

* unten: Keine zusätzliche Zugabe (-) von DNA in den PCR-Ansatz. Überprüfung ob mit dieser Extraktion im Stuhl vorkommende DNA erhalten werden kann

PCR-negativ: -

PCR-positiv: + ; schwach positiv (+)

1/10, 1/100, 1/1000: Verdünnungen des Stuhlextraktes zur Ausdehnung des Inhibitors

Colestyramin = Colestyramin 20 (2% Divinylbenzol), Dowex = Dowex 1 x 4-50 (4% Divinylbenzol); Amberlite = Amberlite IRA-900 (kein Divinylbenzol)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung, gegebenenfalls auch Analyse, von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäurehaltige Probe zur Abtrennung von Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analysereaktion mit einer wäßrigen, bis 10 Gew.-%igen Colestyramin-Harzsuspension versetzt wird, wobei als Colestyramin das Colestyramin 20 eingesetzt wird, das ein Copolymeres von Styrol und etwa 2% Divinylbenzol mit in die Netzstruktur eingefügten quartären Ammoniumgruppen darstellt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure nach der Behandlung der Nuklein-

DE 197 31 670 C 2

säurehaltigen Probe mit Colestyramin durch Phenolextraktion mit anschließender Alkoholpräzipitation isoliert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierte Nukleinsäure zur nachfolgenden Analyse einer Polymerase-Kettenreaktion unterworfen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerase-Kettenreaktion in Gegenwart von Trägerprotein erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerprotein-Konzentration mehr als 50 µg/ml beträgt.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet,

daß in der Polymerase-Kettenreaktion folgende Konzentrationen eingesetzt werden:

Trägerproteinkonzentration: 120-200 µg/ml, Konzentration jedes Desoxyribonukleosid-Triphosphats: 175-225 µM, und

Konzentration jedes Primers: 0,75-1,25 µM.

- Leerseite -